

## COMPARAÇÃO DE SEIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *GIARDIA DUODENALIS*

### COMPARISON OF SIX METHODS FOR GENOMIC DNA EXTRACTION FROM *GIARDIA DUODENALIS* CYSTS

Paulo Henrique Exterchoter Weiss<sup>1</sup>, Rosiléia Marinho de Quadros<sup>2</sup>, Luiz Claudio Milletti<sup>1</sup>, Sandra Márcia Tietz Marques<sup>3</sup>

Clin Biomed Res. 2016;36(1):4-10

1 Laboratório de Hemoparasitas e Vetores, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Lages, SC, Brasil.

2 Faculdade de Ciências Biológicas e Biomedicina, Universidade do Planalto de Santa Catarina (UNIPLAC). Lages, SC, Brasil.

3 Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

#### Autor correspondente:

Sandra Márcia Tietz Marques  
smtmuni@hotmail.com  
Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av. Bento Gonçalves, 9090.  
91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

#### RESUMO

**Introdução:** *Giardia duodenalis* é um parasito gastrointestinal que infecta o homem e uma variedade de animais domésticos e silvestres. A *G. duodenalis* em amostras de origem fecal humana pertence a dois principais grupos genéticos, as assemblagens A e B, também encontradas em animais. Amostras fecais foram analisadas e a extração e purificação do DNA foram realizadas para avaliar a eficácia da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção do gene *gdh* de cistos de *G. duodenalis*.

**Métodos:** A obtenção de amostras de DNA adequadas para protocolos de amplificação genotípicas foi feita por meio da PCR, comparando seis métodos de extração de DNA de cistos de *G. duodenalis* em amostras purificadas e não purificadas. Foram realizados os métodos *QIAmp DNA Stool Mini Kit*, processo de congelamento e descongelamento, ultrassom, uso de *glass beads*, desnaturação com formamida e o método convencional (fenol/clorofórmio).

**Resultados:** Os métodos com ultrassom e uso de *glass beads* foram mais efetivos na extração do DNA. Não houve diferença entre o uso de amostras purificadas e não purificadas para extração de DNA do protozoário.

**Conclusão:** Verificou-se que tanto amostras purificadas como não purificadas podem ser usadas para extração de DNA de *G. Duodenalis*. Embora vários métodos de extração de DNA sejam preconizados na literatura, no presente estudo o uso de ultrassom e *glass beads* foram mais eficazes.

**Palavras-chave:** *Giardia duodenalis*; cistos; métodos

#### ABSTRACT

**Introduction:** *Giardia duodenalis* is a gastrointestinal parasite that infects human beings and a wide range of domestic and wild animal species. In humans, *G. duodenalis* samples belong to two major genetic groups, assemblages A and B, also found in animals. Human fecal samples have been approved to analyze the effects of DNA purification and extraction to assess the effectiveness of Polymerase Chain Reaction (PCR) in detecting the gene *gdh* from *G. duodenalis* cysts.

**Methods:** Suitable DNA samples for genotypic amplification protocols were obtained by means of PCR, comparing six methods for DNA extraction from *G. duodenalis* cysts in purified and unpurified samples: *QIAmp DNA Stool Mini kit*, freeze-thaw procedure, sonication glass bead disruption, formamide denaturation, and conventional method (phenol/chloroform).

**Results:** The methods of sonication and the use of *glass beads* were more effective in extracting DNA. There was no difference between the use of purified and unpurified samples for protozoan DNA extraction.

**Conclusions:** In the present study we verified that both purified and unpurified samples can be used to *G. duodenalis* DNA extraction. Though various DNA extraction methods are recommended in the literature, the use of sonicator and *glass beads* were more effective in this study.

**Keywords:** *Giardia duodenalis*; cysts; methods

*Giardia duodenalis* é um parasito gastrointestinal que afeta uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem, sendo responsável por quadros de diarreia normalmente de caráter autolimitante, podendo ocorrer tanto em regiões tropicais como temperadas<sup>1</sup>.

Embora tenham sido descritas mais de 50 espécies de *Giardia*, classificadas de acordo com a ocorrência em determinados hospedeiros<sup>2</sup>, atualmente com base na morfologia das formas parasitárias são reconhecidas seis espécies: *G. Agilis*, que parasitam anfíbios; *G. muris*, que infectam roedores, pássaros e répteis; *G. duodenalis* (sin. *G. intestinalis* ou *G. lamblia*), que infecta uma variedade de mamíferos incluindo os seres humanos, assim como aves e répteis; além de *G. psittaci* e *G. ardeae*, que parasitam aves<sup>2</sup>; e *G. microti*, que parasita roedores (ratazana e rato almiscarado)<sup>3</sup>.

A maioria das espécies de *Giardia* apresenta alta especificidade de hospedeiro, porém a *G. duodenalis* infecta uma variedade de vertebrados mamíferos, sendo importante a aplicação de técnicas moleculares para a determinação de diversidades genéticas intra-específicas<sup>1,4</sup>.

A biologia molecular tem sido uma ferramenta poderosa para a caracterização de isolados de *Giardia*. A análise das diferenças genéticas anteriormente não reconhecidas tem revolucionado a compreensão sobre a taxonomia, a genética de populações e a epidemiologia da giardiose em seres humanos e animais<sup>5</sup>.

Segundo critérios moleculares, amostras de origem fecal humana pertencem a dois principais grupos genéticos descritos como Assemblages A e B<sup>6</sup>. Em animais, os sequenciamentos dos genótipos identificaram, além de genótipos descritos em humanos, outros com maior especificidade parasitária, os quais não se observa nos genótipos de humanos.

Os diferentes genótipos de *G. duodenalis* podem enfatizar o risco potencial que os animais infectados podem desempenhar na saúde pública em regiões onde não é conhecida a frequência com que a transmissão ocorre, e desta forma faz-se importante a genotipagem de casos positivos para verificar quais formas de transmissão do protozoário estão ocorrendo<sup>7</sup>.

O foco da utilização dos métodos de extração do DNA está em obter melhor desempenho, com rapidez, além de evitar extensos passos de purificação das

amostras<sup>8</sup>. Com base nessas informações, o estudo teve por objetivo analisar os efeitos da purificação e extração de DNA para avaliar a eficácia da reação em cadeia da polimerase (PCR) pela detecção do gene *gdh* de cistos de *G. duodenalis*.

## MÉTODOS

Amostras fecais de origem humana foram aprovadas para análises segundo o Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), conforme parecer 005-09. Cistos de *G. duodenalis* foram detectados através de exame fecal pela técnica de sedimentação espontânea. As amostras positivas foram armazenadas em microtubos com capacidade de 1,5 mL em álcool etanol 96°GL<sup>9,10</sup>, e formaldeído a 5% como meio de conservação<sup>11</sup>.

Para verificar a eficácia da metodologia para extração de DNA genômico de *G. duodenalis*, duas amostras entre purificadas e não purificadas contendo cistos de *Giardia* foram submetidas a seis diferentes tipos de extração de DNA, totalizando 24 amostras. Os métodos de extração foram: (1) o *QIAmp DNA Stool Mini kit* (QIAGEN, Alemanha); (2) processo de congelamento e descongelamento<sup>12</sup> (3) processo de extração por Ultrassom<sup>13</sup>; (4) Extração por *glass beads*<sup>14</sup>, (5) extração pela formamida<sup>15</sup> (6), e método convencional (Fenol/Clorofórmio)<sup>12</sup>. Para a extração foram utilizadas apenas amostras que continham mais de 10<sup>3</sup> cistos/mL, para isso os cistos foram contados em câmara de Neubauer.

### Retirada dos Conservantes das Amostras

Antes da extração de DNA dos cistos de *G. duodenalis*, as amostras foram lavadas para a retirada dos conservantes. Primeiramente as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de água Mili Q (ultra pura) e novamente centrifugado a 10.000 x g por 10 min. Esse processo foi repetido duas vezes, e posteriormente o *pellet* foi ressuspenso diretamente no tampão de extração conforme o método utilizado.

### Purificação das Amostras

As amostras livres de conservantes foram colocadas em sulfato de zinco (1,2 M) com o dobro do volume da amostra recuperada, e centrifugadas

a 400 x g por 2 min. a 4 °C<sup>16</sup>. A camada superficial do sobrenadante onde se concentram os cistos de *Giardia* foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se o dobro do volume da amostra de água Mili Q, novamente centrifugada a 14.000 x g por 10 min. a 4 °C, para garantir a retirada de sais do sulfato de zinco que danificam a morfologia dos cistos. Após, ao *pellet* foram adicionados os diferentes tipos de tampão de extração. Igual número de amostras não purificadas foram utilizadas para os seis processos de extração.

### Extração do DNA de *G. duodenalis*

Para verificar a qualidade das amostras, foram testadas duas amostras não purificadas e duas purificadas na comparação entre os seis métodos de extração de DNA.

### QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Alemanha)

Para a utilização do *kit* comercial da QIAGEN, 200 µL de cada amostra foram diluídos para extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi mantido a -20 °C até a sua utilização.

### Processo de congelamento e descongelamento

Ao sedimento das amostras contendo cistos de *Giardia*, foram adicionados 1,5 mL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0)<sup>12</sup>. A suspensão do sedimento foi obtida usando um agitador mecânico com baixa velocidade. Após, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido (-196 °C) por 5 min. e descongeladas por 5 min. a 95 °C, por três vezes. Posteriormente foram adicionados 15 µL de proteinase K em cada amostra, as quais foram mantidas a 42 °C *over night*.

A remoção dos restos celulares e proteicos obtidos pela digestão da proteinase K foi feita com fenol/clorofórmio. O DNA foi precipitado com 10% de acetato de sódio (3M, pH 5.2) e adicionou-se duas vezes e meio o volume de etanol absoluto, deixando em repouso por 12 horas. Após, a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 30 min. a 4 °C. Posteriormente o sedimento foi lavado com 300 µL de etanol a 70% e centrifugado a 20.000 x g por 10 min. a 4 °C, sendo repetido duas vezes o processo. O sedimento foi secado em concentrador por 20 min. a 45 °C e então foi eluído em 50 µL de água Milli Q por 12 horas a 4 °C, e congelado a -20 °C para posterior análise.

### Processo de extração por ultrassom

No processo de extração de DNA de cistos de *G. duodenalis* por ultrassom<sup>14</sup>, o sedimento contendo cistos de *Giardia* foi adicionado de 1,5 mL de tampão

TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) e suspenso usando agitador mecânico com baixa velocidade. Após, a amostra foi submetida ao ultrassom Sonoplus 2200 Bandelin por 4 ciclos de 30 segundos (50 Hertz) e intervalo de 1 min., sob temperatura de 4 °C. Após o término deste procedimento, os restos celulares e proteínas foram extraídos com fenol/clorofórmio no processo de congelamento descongelamento, sendo que depois de seco o sedimento foi eluído em 50 µL água Mili Q por 12 horas a 4 °C e então armazenado a -20 °C.

### Uso de glass beads

A extração de DNA foi realizada usando *glass beads*<sup>15</sup> (SIGMA - ALDRICH). As *glass beads* foram submetidas ao hidróxido de potássio (1M) por 5 min. e depois lavadas com água destilada e mergulhadas em ácido clorídrico (1M) por 5 min., novamente lavadas com água destilada e etanol absoluto por duas vezes durante 5 min. e armazenadas em tampão tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 10mM, pH 7.5) até o seu uso.

O sedimento contendo cistos foi suspenso em 1 mL de solução tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0), sendo adicionada as *glass beads*. As amostras foram mantidas sob agitação por meio de agitador mecânico (vórtex) por 20 min. Após, adicionou-se proteinase K, o sedimento foi incubado por 60 min. a 65 °C e centrifugado a 10.000 x g por 5 min. e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A seguir, os restos celulares e proteínas foram extraídos com fenol/ clorofórmio; depois de seco, o sedimento foi eluído em 50 µL água Mili Q por 12 horas a 4 °C, e posteriormente armazenado a -20 °C.

### Método da formamida

O total de 200 µL de cada amostra foi suspenso em 750 µL de água Mili Q e aquecido a 65 °C. Uma quantidade igual de formamida também foi aquecida a 65 °C e depois transferida para microtubos contendo a suspensão de cistos de *Giardia*, que foi fervida por 10 min., então centrifugada a 5.000 x g por 1 min.; o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, precipitado com 10% de acetato de sódio (3M pH 5.2) e adicionado duas vezes e meia de etanol absoluto por 12 horas a -20 °C, centrifugada a 20.000 x g por 30 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, foi feita uma lavagem com etanol 70% e centrifugado a 20.000 x g por 10 min. a 4 °C. Esse processo foi repetido duas vezes, então o sedimento foi secado em concentrador (*eppendorff*) por 20 min. a 45°C, e após eluído em 50 µL de água Milli Q por 12 horas a 4 °C e congelado a -20 °C para posterior análise.

**Método convencional (fenol/ clorofórmio)**

O pellet foi suspenso em 500 µL de tampão de extração (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 25nM, SDS 1%), e 2,5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados, deixado *overnight* a 42 °C. Então, a extração dos restos celulares e proteínas com fenol/clorofórmio foi realizada, com a adição do dobro do volume de fenol ao tubo, o qual foi homogeneizado com inversões por 10 min., centrifugado a 14.000 x g por 10 min. a 4 °C. A parte líquida foi transferida para um microtubo, acrescentado de igual volume de fenol/clorofórmio (500 µL/500 µL). O tubo foi homogeneizado por inversão durante 10 min. e centrifugado na mesma rotação e mesma temperatura. Novamente a parte líquida foi transferida para um novo microtubo adicionada de igual volume de clorofórmio puro. A amostra foi homogeneizada por inversão durante 10 min. e novamente centrifugada na mesma rotação e temperatura das fases anteriores. O DNA foi precipitado com 60% de isopropanol gelado, por 10 min. em temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 14.000 xg por 10 min. a 4 °C. Posteriormente o sedimento foi lavado com 300 µL de etanol a 70% e centrifugado a 20.000 x g por 10 min. a 4 °C este processo foi repetido duas vezes, então o sedimento foi seco em concentrador (*ependorff*) por 20 min. a 45 °C, eluído em 50 µL de água Milli Q por 12 horas a 4 °C, e congelado a -20 °C para posterior análise.

Para testar o DNA resultante dos métodos de extração, as amostras mantidas preservadas foram submetidas à amplificação por *semi-Nested* PCR usando o gene *gdh*<sup>17,18</sup>.

O fragmento da amplificação foi de 432 pares de bases sendo usados os *primers*: (1) GDHeF: TCAACGTAAAYCGYGGYTTCCGT; (2) GDHiF: CAGTACAACCTCYGCTGG; (3) GDHiR: GTTRTCCTTGACATCTCC.

A reação de PCR consistiu em 12,5 pmol de cada primer, 300 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 unidades de *Tth* DNA polimerase (Promega), e Buffer *Tth*, o volume final da reação foi de 25 µL, utilizado para primeira reação os *primers* GHDiR e

GDHeF com 3 µL de DNA genômico. Para a segunda reação (*semi-nested* PCR), foram utilizados 3 µL da primeira reação e os *primers* GHDiR e GDHiF, usando iguais constituintes da primeira reação. O termociclador da Biocycler foi utilizado nas seguintes condições de amplificação: 1 ciclo a 94 °C por 2 min.; 56 °C por 1 min.; 72 °C por 2 min. Posteriormente mais 55 ciclos de 94 °C por 30 s., 56 °C por 20 s. e 72 °C por 45 s. e uma extensão final de 72 °C por 7 min. e 4 °C *hold*.

A visualização da amplificação do DNA foi através da eletroforese em gel de agarose a 2%.

**RESULTADOS**

Em relação à preservação das amostras, observou-se que tanto o uso de álcool etanol a 96°GL quanto o formol a 5% foram eficazes na preservação de cistos de *G. duodenalis*. O método de conservação usando o formaldeído na concentração usada neste estudo também foi eficaz para o isolamento de DNA do protozoário, no qual 71,66% das amostras foram amplificadas utilizando o gene *tpi* (triofosfato isomerase)

Os métodos de extração de cistos de *G. duodenalis* pelo uso do *QIAmp DNA Stool Mini Kit*, embora amplamente utilizados no mundo inteiro, não apresentaram eficácia para a extração no presente estudo. O mesmo ocorreu com os métodos utilizando formamida e o método convencional (fenol/clorofórmio), que também não foram eficazes para extração de DNA de cistos de *G. duodenalis*, conforme mostra a Tabela 1.

A eficácia desses métodos foi comprovada pela visualização de sedimentos e restos celulares a cada método de extração em microscopia óptica. Nos métodos utilizados, *QIAmp DNA Stool Mini Kit*, formamida e método convencional (fenol/clorofórmio), observou-se que havia uma grande quantidade de cistos de *Giardia*, demonstrando assim que esses métodos não são eficazes no rompimento da membrana cística do cisto. Já o método de congelamento e descongelamento também não apresentou eficácia

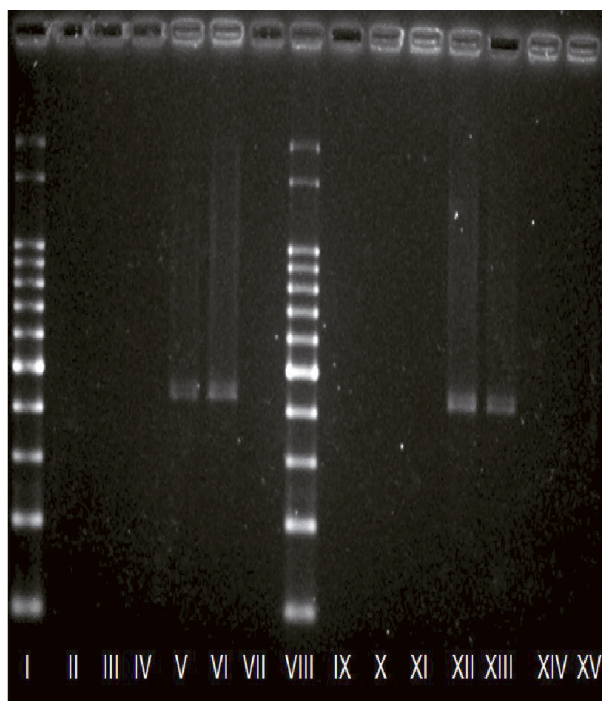
**Tabela 1:** Resultados entre seis métodos de extração de DNA genômico de cistos de *G. duodenalis*.

Métodos Extração	Amostras Purificadas	Amostras Não Purificadas
<i>Kit</i> QIAmp DNA Stool Mini	-	-
Congelamento - Descongelamento	-	-
Ultra - som	+	+
<i>Glass beads</i>	+	+
Formamida	-	-
Método Convencional (Fenol-clorofórmio)	-	-
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

para a extração do DNA genômico, uma vez que havia também sedimentos e restos celulares, bem como a presença de cistos morfologicamente deformados, ainda com membrana cística, o que impede a extração do DNA genômico.

O método pela utilização do ultrassom e o método do *glass beads*, foram os mais eficazes para a extração de DNA neste trabalho. Na microscopia não foram encontrados sedimentos, produtos de extração e cistos de *Giardia*, o que garantiu o sucesso desses procedimentos.

A Figura 1 mostra os resultados da eletroforese em gel de agarose a 2% da amplificação do DNA pela técnica de PCR. Observa-se na figura a formação de bandas no fragmento amplificado em V e VI (amostras não purificadas) e XII e XIII (amostras purificadas), ambos nos métodos utilizados para extração de DNA com ultrassom e *glass beads*, respectivamente. Nos demais métodos de extração não foi possível a amplificação.



**Figura 1:** Eletroforese em gel de agarose a 2%. I - Marcador de peso molecular; II - método convencional (fenol-clorofórmio)\*; III - Método de congelamento e descongelamento\*; IV - Kit QIAmp DNA Stool Mini\*; V - Método ultra-som\*; VI - Método Glass beads\*; VII - Método Formamida\*; VIII - Marcador de peso molecular; IX - Método clássico\*\*; X - Método de congelamento e descongelamento\*\*; XI - kit QIAmp DNA Stool Mini\*\*; XII - Método ultra-som\*\*; XIII - Método Glass beads\*\*; XIV - Método Formamida\*\*; XV - Controle negativo. \* Amostras não purificadas e \*\* Amostras purificadas.

## DISCUSSÃO

Os métodos de extração de cistos de *G. duodenalis* pelo uso do *QIAmp DNA Stool Mini Kit* foram amplamente utilizados no mundo inteiro<sup>16,19-21</sup> bem como métodos utilizando formamida e fenol/clorofórmio foram utilizados por vários estudos para o diagnóstico molecular para *Giardia*<sup>22,23</sup>. O uso do *QIAmp DNA Stool Mini Kit* e do método convencional (fenol/clorofórmio) não foram os melhores métodos para a extração de DNA de cistos de *G. duodenalis*, também em outros estudos<sup>24</sup>, corroborando com o resultado deste estudo; porém alguns pesquisadores afirmam que o *QIAmp DNA Stool Mini Kit* foi mais sensível e menos demorado no procedimento em comparação ao método de extração convencional (fenol/clorofórmio)<sup>25</sup>.

A parede do cisto é constituída por açúcares e proteínas<sup>26</sup>, a elevada insolubilidade da parede do cisto está relacionada aos carboidratos e parte das proteínas que formam a parede do protozoário, essenciais para a sobrevivência do parasito fora do hospedeiro, bem como resistência aos desinfetantes utilizados em água e drogas usadas para o tratamento da enfermidade<sup>27</sup>. A parede do cisto apresenta três proteínas (CWP1, CWP2 e CWP3) e um monossacarídeo ( $\beta$ -1,3 N-acetilgalactosamina) conhecido por GalNac, presente somente na fase de cisto. Este açúcar é responsável principalmente pelo processo de encistamento do protozoário. Embora os cistos de *Giardia* sejam facilmente rompidos pelo sonicador, a GalNac confere certa resistência à destruição da parede. Em decorrência dessa composição do cisto, a extração do DNA do protozoário pode ser dificultada e conseqüentemente levar ao insucesso da genotipagem<sup>28</sup>.

Os métodos utilizados não detectaram diferenças na utilização de amostras purificadas ou não, tanto as amostras que foram submetidas ao processo de purificação pelo Sulfato de Zinco quanto as amostras nas quais se utilizaram o sedimento total apresentaram resultados similares na realização dos métodos empregados de extração.

No presente estudo o marcador molecular foi o gene da *gdh* de 432 pares de bases (pb), gene esse considerado o mais útil na genotipagem de isolados de *Giardia*<sup>17</sup>. A *gdh* é uma enzima que desempenha importante função no metabolismo de carboidratos, assimilação de amônia e síntese de aminoácidos. O gene *gdh* mostrou-se uma ferramenta eficiente, pois apresenta um alto grau de polimorfismo que permite diferenciar os isolados em nível genotípico e intragenotípico<sup>29</sup>, sendo útil tanto para o diagnóstico molecular quanto para a diferenciação de genótipos de potencial zoonóticos.

## CONCLUSÃO

Através deste estudo verificou-se que tanto amostras purificadas como não purificadas podem ser utilizadas para extração de DNA de cistos de *G. duodenalis*, porém os métodos utilizando ultrassom e *glass beads* foram mais eficazes e apresentaram reprodutibilidade em relação aos demais métodos. No entanto, devido às diferenças entre autores que utilizam diversos protocolos de extração que aqui não foram eficazes, faz-se necessária a realização de maiores estudos para uma efetiva padronização do método e a garantia

de uma melhor amplificação dos resultados obtidos na PCR.

## Agradecimentos

Ao Bioquímico Rafael de Lima Miguel pelo auxílio na obtenção das amostras e à FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina) pelo financiamento parcial deste projeto.

## Conflito de interesse

Nada a declarar.

## REFERÊNCIAS

- Thompson RC. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 2004;126(1-2):15-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.008>. PMID:15567577.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):447-75. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>. PMID:11432808.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol.* 2003;3(1):29-38. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00149-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00149-1). PMID:12797970.
- Appelbee AJ, Thompson RC, Olson ME. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife: current status and future needs. *Trends Parasitol.* 2005;21(8):370-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.004>. PMID:15982929.
- Cantos GA, Galvão M, Linécio J. Comparação de métodos parasitológicos tendo como referencial o Método de Faust para a pesquisa de cistos de protozoários. *NewsLab.* 2011;104:160-5.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25(2):93-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>. PMID:19135417.
- Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 2008;177(1):18-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.09.022>. PMID:18032076.
- Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol Proced Online.* 1998;1(1):40-7. <http://dx.doi.org/10.1251/bpo6>. PMID:12734590.
- Wilke H, Robertson LJ. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods.* 2009;78(3):292-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.06.018>. PMID:19576935.
- Thompson RC, Smith A, Lymbery AJ, Averis S, Morris KD, Wayne AF. *Giardia* in Western Australian wildlife. *Vet Parasitol.* 2010;170(3-4):207-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.012>. PMID:20211528.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, et al. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(7):718-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.002>. PMID:18485429.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- Qader AM, Bakir TY. Molecular identification of *Giardia duodenalis* parasite isolates from human by polymerase chain reaction: restriction fragment length polymorphism technique (PCR-RFLP) in Baghdad Province. *Diyala J Pure Science.* 2011;7:54-66.
- Becker PB. *Methods in molecular biology*. Totowa: Humana Press; 1999. p. 17-26.
- Abbaszadegan M, Gerba CP, Rose JB. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57(4):927-31. PMID:2059051.
- Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RC. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol.* 2008;154(1-2):142-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.031>. PMID:18395349.
- Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 2004;4(2):125-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>. PMID:15157630.
- Volotão AC, Costa-Macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007;102(1):10-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.02.010>. PMID:17428432.
- Rimhanen-Finne R, Enemark HL, Kolehmainen J, Toropainen P, Hänninen ML. Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):345-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.008>. PMID:17320291.

20. Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 2011;178(3-4):342-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.029>. PMID:21324592.
21. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, et al. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1262. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001262>. PMID:21829745.
22. Eligio-García L, Cortés-Campos A, Jiménez-Cardoso E. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polymerase chain reaction (multiplex). *Parasitol Res.* 2008;103(4):797-800. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-008-1042-0>. PMID:18551318.
23. Meireles P, Montiani-Ferreira F, Thomaz-Soccol V. Survey of giardiasis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, Southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;152(3-4):242-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.025>. PMID:18261855.
24. Nantavisai K, Mungthin M, Tanariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):581-3. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01823-06>. PMID:17122010.
25. Deng MQ, Cliver DO. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. *J Microbiol Methods.* 1999;37(2):193-200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00067-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00067-6). PMID:10445319.
26. Chávez-Munguía B, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. *J Eukaryot Microbiol.* 2004;51(2):220-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00549.x>. PMID:15134259.
27. Gerwig GJ, van Kuik JA, Leeftang BR, Kamerling JP, Vliegthart JFG, Karr CD, et al. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-Acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology.* 2002;12(8):499-505. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwf059>. PMID:12145190.
28. Chatterjee A, Carpentieri A, Ratner DM, Bullitt E, Costello CE, Robbins PW, et al. *Giardia* cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001059. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001059>. PMID:20808847.
29. Plutzer J, Karanis P, Domokos K, Törökné A, Márialigeti K. Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of SSU rRNA and GDH genes. *Int J Hyg Environ Health.* 2008;211(5-6):524-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.04.004>. PMID:18550431.

Recebido: Out 15, 2015

Aceito: Jan 21, 2016